平成２５年度農政課題解決研修
ジャガイモなどの土壌センチュウ、
ウイルス病の同定・診断・防除技術

研修テキスト

本研修テキストについては、引用等著作権法上認められた行為を除き、
北海道農業研究センターの許可なく複製、転載はできませんので、利用さ
れる場合は北海道農業研究センター（連絡先：電話番号：011-857-9490）
にお問い合せ下さい。

平成２５年度革新的農業技術に関する研修

研修課題等	研修目的、内容
難防除センチュウ・ウイルスの同定・診断と環境に配慮した防除技術［Ｂ２２］	ジャガイモや野菜類の難防除病害虫である土壌センチュウ（ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウ、シストセンチュウ等）およびウイルスの最新の診断法および生態的特性を利用した防除技術について習得する。

日　付	研修内容又は指導内容等	研修方法	研修指導者名	研修実施場所
10月2日 ～10月4日 （3日間）	・有害線虫の種類と生態 ・線虫の調査法と診断・種類同定法 ・線虫種の遺伝子診断法 ・有害線虫の防除技術 ・植物ウイルスの遺伝子・血清診断法	講義 および 実習	北海道農業研究センター 奈良部　孝 相場　聡 伊藤　賢治 串田　篤彦 眞岡　哲夫 大木　健広 九州沖縄農業研究センター 岩堀　英晶 中央農業総合研究センター 関本　茂行	北海道農業研究センター 第1会議室 ﾐｰﾃｨﾝｸﾞﾙｰﾑ1 第3会議室 線虫隔離実験室 電顕室

使用する研修テキスト

「線虫学実験法」日本線虫学会，2004 年 3 月発行，247pp.

参考テキスト

「線虫の見分け方」植物防疫特別増刊号 No.8，日本植物防疫協会，2004 年 5 月発行，99pp.

Ⅰ　作物を加害する主要な線虫（北日本）

１．ネコブセンチュウ *Meloidogyne*

寄主植物の根にこぶ（ゴール）を形成し、養水分を奪い生育を阻害する。症状が進行すると全体的な生育不良、地上部の萎凋・枯れ上がり等が認められる。根菜類では岐根・奇形が生じる。

日本には１３種が報告されているが、そのうち畑作物・野菜を加害する重要種は、**サツマイモネコブセンチュウ**、**アレナリアネコブセンチュウ**、**キタネコブセンチュウ**の３種であり、四国・九州の南部から沖縄にかけては**ジャワネコブセンチュウ**が加わる。いずれも寄主範囲が広い。施設栽培ではサツマイモネコブセンチュウの検出割合が圧倒的に多い。その他、果樹（特にリンゴ）を加害する**リンゴネコブセンチュウ**が知られる。

サツマイモネコブセンチュウに加害されたトマト根

キタネコブセンチュウに加害されたニンジン

２．ネグサレセンチュウ *Pratylenchus*

根に褐色壊死斑が形成され、寄生程度が著し場合は壊死斑が癒合して根のくびれ・脱落を生じ、根菜類では岐根・寸詰まりとなる。作物や寄生程度によっては病斑が不鮮明で、地上部には目立った症状が現れない作物が多い。

日本には１８種が記録されているが、**キタネグサレセンチュウ**が寄主範囲が広く最重要加害種である。また、関東以南では**ミナミネグサレセンチュウ**も重要な加害種である。その他、寄主範囲の広い**ノコギリネグサレセンチュウ・ムギネグサレセンチュウ**、果樹やイチゴを加害する**クルミネグサレセンチュウ**、チャやリンゴなど木本を加害する**チャネグサレセンチュウ**などが知られる。

キタネグサレセンチュウによる被害（左からダイコン、ニンジン、ゴボウ）

３．シストセンチュウ *Heterodera, Globodera*

寄主植物の根に白色のちに褐色のシスト（体内に卵を保有した皮嚢）を形成する。寄生密度が高い場合、地上部の生育抑制、葉色の退緑・黄化、萎凋、下葉の枯れ落ち等の症状が現れる。

日本には１２種が報告されているが、いずれも寄主植物が限定される。そのうち**ジャガイモシストセンチュウ**（ジャガイモ、トマト）、**ダイズシストセンチュウ**（ダイズ、アズキ）、**クローバシストセンチュウ**（クローバ類、カーネーション）が重要種である。

ダイズシストセンチュウに加害されたダイズ畑

ダイズ根に寄生するダイズシストセンチュウ雌成虫

４．ハセンチュウ *Aphelenchoides*

（ハガレセンチュウ、イチゴセンチュウ、イネシンガレセンチュウ）

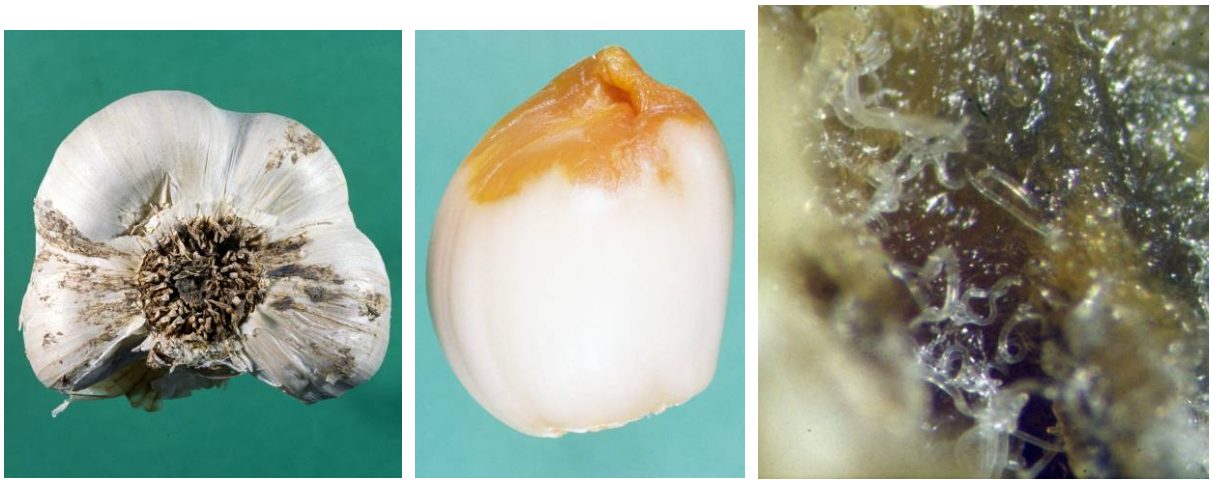
作物の地上部に寄生して被害を与える。**ハガレセンチュウ**は主にキク科植物を加害し、葉の斑点や下葉の枯れ上がり、奇形花を生じる。**イチゴセンチュウ**はイチゴのほか各種花卉類を加害し、着果不良や葉全体の枯死を生じる。**イネシンガレセンチュウ**はイネを加害し、止葉の先が枯れて細く縮れ（ほたるいもち）、黒点米や“しいな”が生じる。

イチゴセンチュウに加害されたユリ

同ユリの被害葉（分離線虫数 左から 11,000、12,000、100 頭）

５．クキセンチュウ *Ditylenchus*

球根に寄生し、鱗球の褐変・壊疽、腐敗を生じる。**イモグサレセンチュウ**はニンニク・アイリスを加害し、**ナミクキセンチュウ**はスイセン等（北海道ではシバザクラの枯死例も）を加害する。



イモグサレセンチュウによるニンニク鱗茎の被害症状（左、中）と鱗茎内の線虫（右）

Ⅱ　線虫分離法

１．サンプリング法　（研修テキスト p.78-86）

土壌線虫のサンプリングでは、採土法と採集した土壌コアの取り扱いがサンプルの質に大きく影響する。

1) 土壌採種器具

移植ごて（日本で一般的）、半管状土壌サンプラー（栽培期間中の採土に有利）

2) 採土するパターン

組織的（系統的）パターンが信頼性高い

例　日本：９点法「検診圃場（10a 目途）を目測で９等分し、各々の中央部から採土した土壌を混合」、米国：８歩法「0.3～0.4ha を単位に分画し、採土点間の距離間隔を８歩とする」

3) 採土する深さ

一般的には表層から 20cm までの深さを採土

4) 土壌の状態

耕起整地後の採土が望ましい、雨天時の採土は避ける

5) 土壌の収納、保管

ポリエチレン袋、直射日光を避ける、室温で数ヶ月保存しても分離数に大きく影響しない

6) 攪拌の影響

激しい振動や長時間の攪拌（1 分以上）は避ける

7) 土壌の定量

水分を含んだ重量を基準、必要に応じてサンプル土壌を乾燥し、土壌水分量を補正

8) サブサンプルの反復

３反復以上、機械的に平均せず、極端に値が異なる場合は除外して平均する

9) 標本サイズの推定

標本抽出精度の算定式に従い、採土するコア数を決定する。

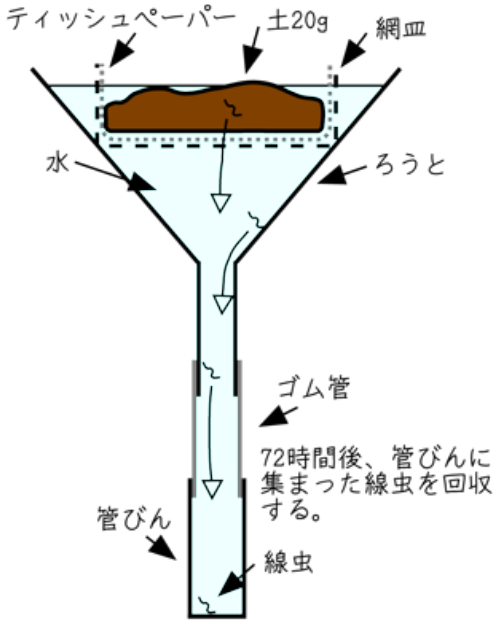
例　50cm×50cm：1 点、10 ㎡以内：16 点、1ha 未満：集中分布かランダムな分布かで異なる

２．土壌からの分離法

（研修テキスト p.86-95）

1）ベルマン法

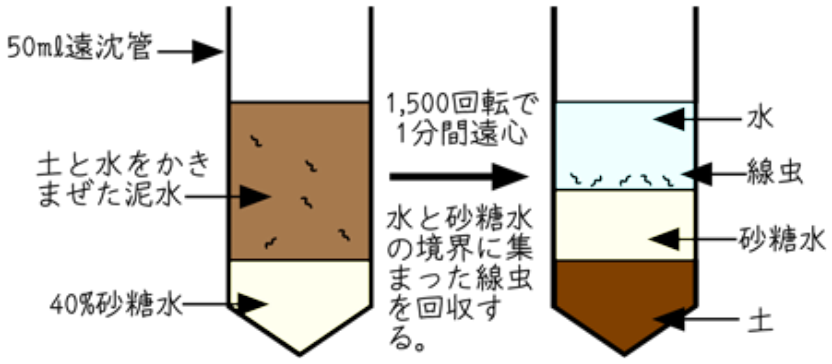
水に浸けた土の中を動く線虫は、自分の重みでだんだん下に落ち、時間が経つと、土の下に敷かれたティッシュを通りぬけて水の中に出る。この方法では運動性の低い線虫は集められないが、観察のときに邪魔になる土壌粒子の混入が少ないというメリットがある。



1. 土壌 20g を、ティッシュペーパーが敷かれた網皿に入れ、水を張ったベルマンろうとに置く。
2. 72 時間後に線虫の集まった管びんを回収する。

2）二層遠沈浮遊法

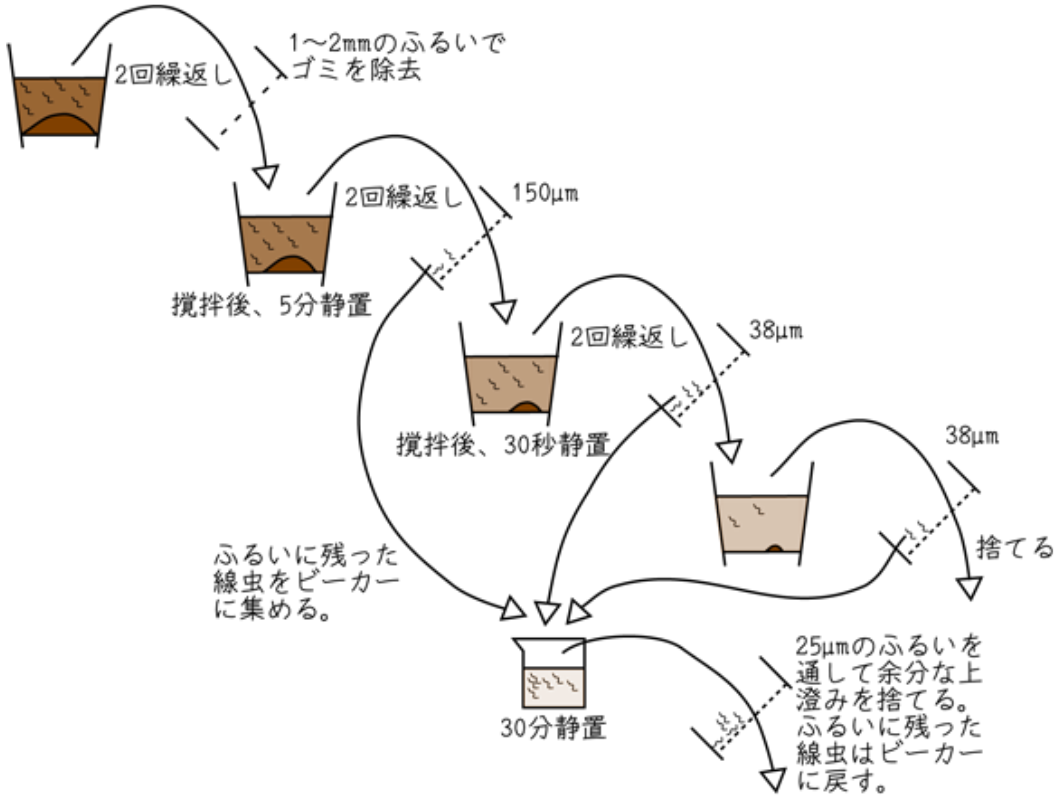
線虫は水より重いので（比重約 1.05）、水の代わりに、比重が重い砂糖水などを使うと、線虫だけを土から浮き上がらせることができる。この方法は回収率が高いのと、短時間でできるというメリットがあるが、砂糖水の影響で線虫が弱ってしまうことがある。



1．50ml の遠沈管に土壌 10g と水 20ml を入れてよくかきまぜる。
2．遠沈管の底までピペットを挿入し、40%砂糖水 10ml を静かに入れる。
3．1,500 回転で 1 分間遠心。泥水は底に沈殿し、線虫は水と砂糖水の境界線に集まる。
4．上澄を 20～40μm のふるいでこして、ふるいの上に残った線虫を集める。あるいは、水と砂糖水の境界線からピペットで線虫を吸い取る。

3) ふるい分け法

ふるいを使って線虫をゴミ・泥から分離する。操作が繁雑な上に、土壌粒子との完全な分離が困難だが、大量の土をベルマン法や二層遠心法にかけられる程度まで少なくするために使われる。



1. 採集した土壌をバケツにあけ、水を加えて塊をくずしながらよくかきまぜる。
2. 泥水をかきまぜながら、1～2mm のふるいを通して別のバケツに受ける。この操作をもう一度繰り返す。
3. 1mm のふるいを通り抜けた泥水を 5 分静置してから 150μm のふるいに通し、ふるいの上に残った線虫をビーカーに回収する（この時、バケツの底にたまった泥をふるいに流すと目詰まりするので注意する)。ふるいを通った水は別のバケツに集めておく。バケツに残った泥に水を加えて、もう一度同じ操作を繰り返す。
4. 150μm のふるいを通りぬけた泥水を 30 秒静置してから 38μm のふるいにかけて、ふるいに残った線虫をビーカーに回収する。バケツに残った泥に水を加えて、もう一度繰り返す。
5. 38μm のふるいを通過した泥水を、念のため、もう一度 38μm のふるいにかけて線虫を回収する。
6. ビーカーに集めた水が多過ぎる場合は、30 分静置した後、余分な上澄みを 25μm のふるいでこしながら捨てる。泥が多く含まれている場合は、二層遠心浮遊法などで線虫だけを分離する。

３．根・植物体からの分離法（研修テキスト p.95-100）

Ⅲ 被害査定法

１．ネコブセンチュウ（研修テキスト p.103-105）

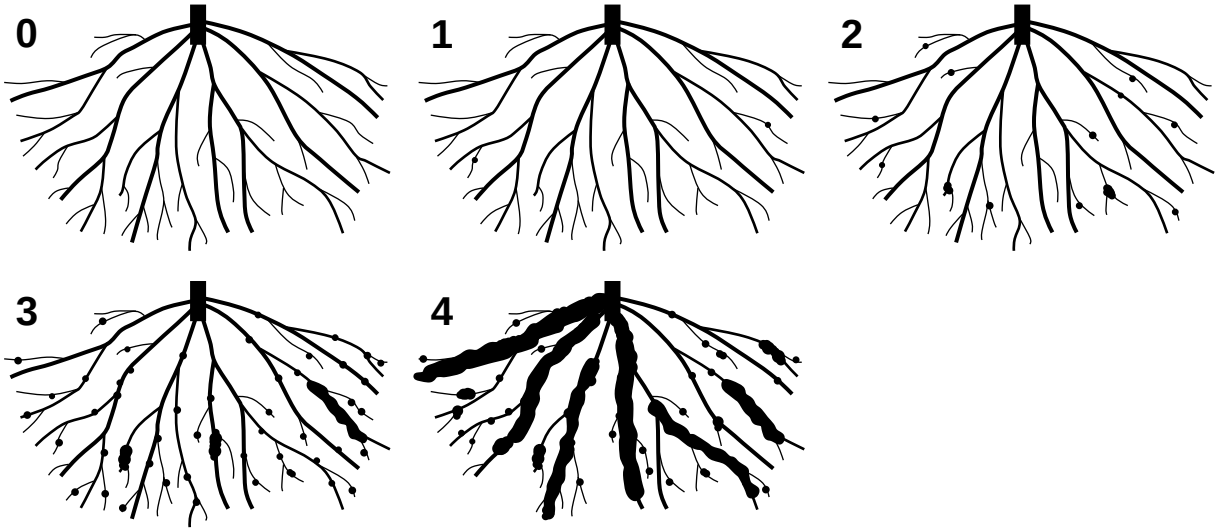


図　トマトの根こぶ程度

サツマイモネコブセンチュウ汚染圃場でトマトを 90 日以上栽培した場合の判定基準

0：根こぶ無し。

1：根こぶがわずかに認められるが被害は目立たない。

2：一見して根こぶが認められる。大きな根こぶやつながった根こぶは少ない。

3：大小の根こぶが多数認められる。根こぶに覆われて太くなった根も見られるが、根系全体の 50%以下。

4：多くの根が根こぶだらけで太くなっている。

根こぶ指数（gall index）は、株ごとの根こぶ程度を調査区の平均値に直したもので、百分率に換算されて示される。

根こぶ指数 = 調査区の根こぶ程度の平均値　／4　×　100

２．シストセンチュウ（研修テキスト p.105-106）

シストの寄生程度（０～４）を判定、シスト指数（０～100）を算出

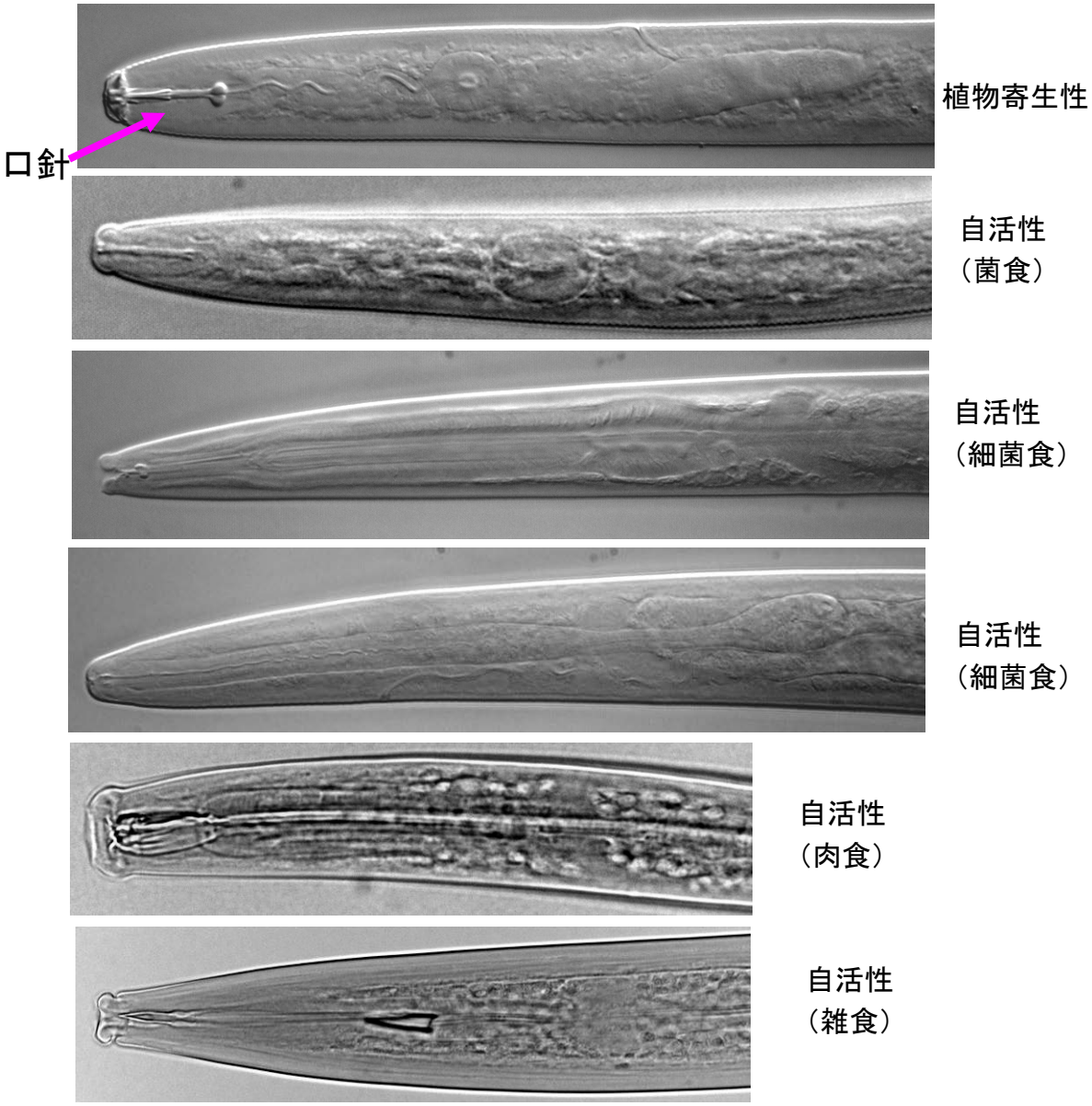
３．ネグサレセンチュウ（研修テキスト p.106-108）

ネグサレセンチュウ被害程度（０～４：作物によりそれぞれ例示有り）を判定、ネグサレ指数（０～100）を算出

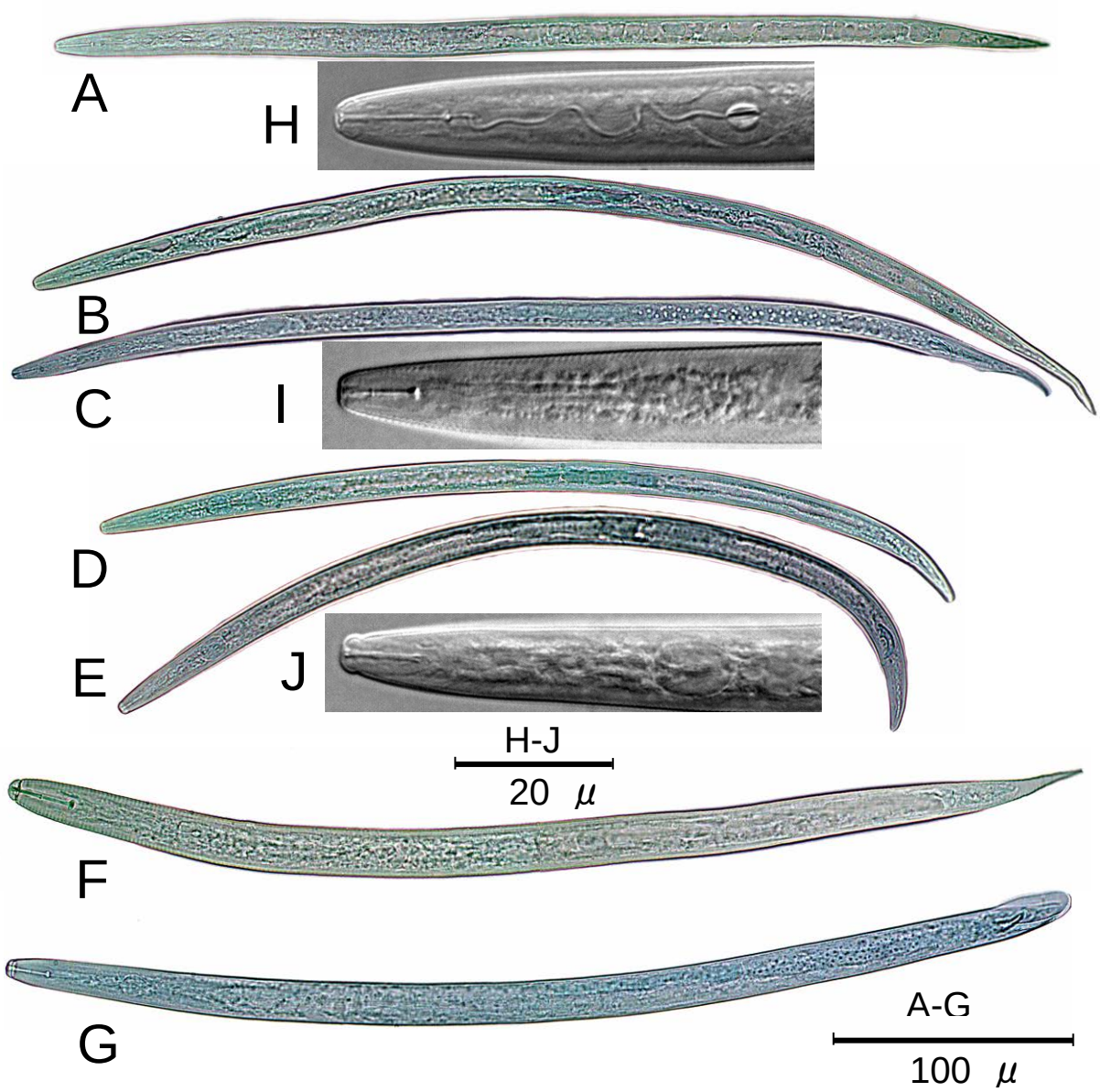
Ⅳ　顕微鏡を用いた線虫の形態観察

１．生体観察と固定標本観察（研修テキスト p.9-24）

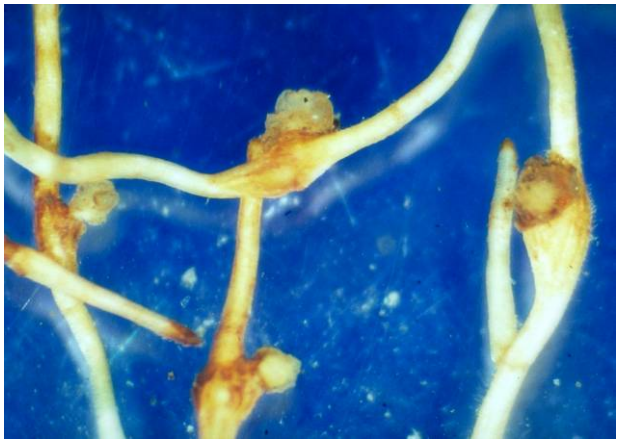
２．植物寄生性線虫と自活性線虫の区別



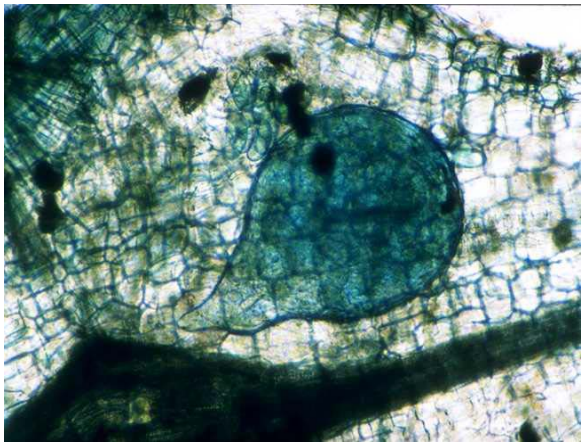
◎ネコブセンチュウ（A，H)、ネグサレセンチュウ（G)、シストセンチュウ（F）と
間違えやすい線虫
糸状菌食線虫（B，C，Ｉ：ティレンクス科線虫、B：雌成虫，C：雄成虫，Ｉ：頭部拡大、
D，E，Ｊ：アフェレンコイデス属線虫、D：雌成虫，E：雄成虫，Ｉ：頭部拡大）



３．ネコブセンチュウの特徴（参考テキスト p.11-16）



根にこぶ（ゴール）を形成
ゴールの頂部には卵嚢（卵塊）が認められる

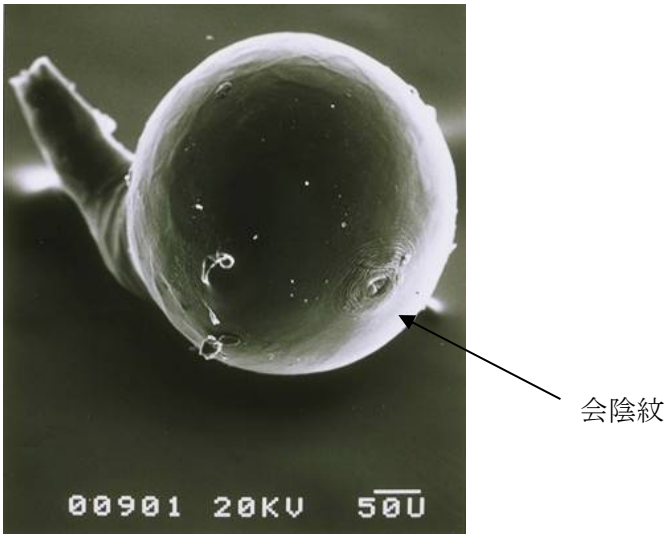


ゴール内には洋ナシ型の雌成虫が認められる

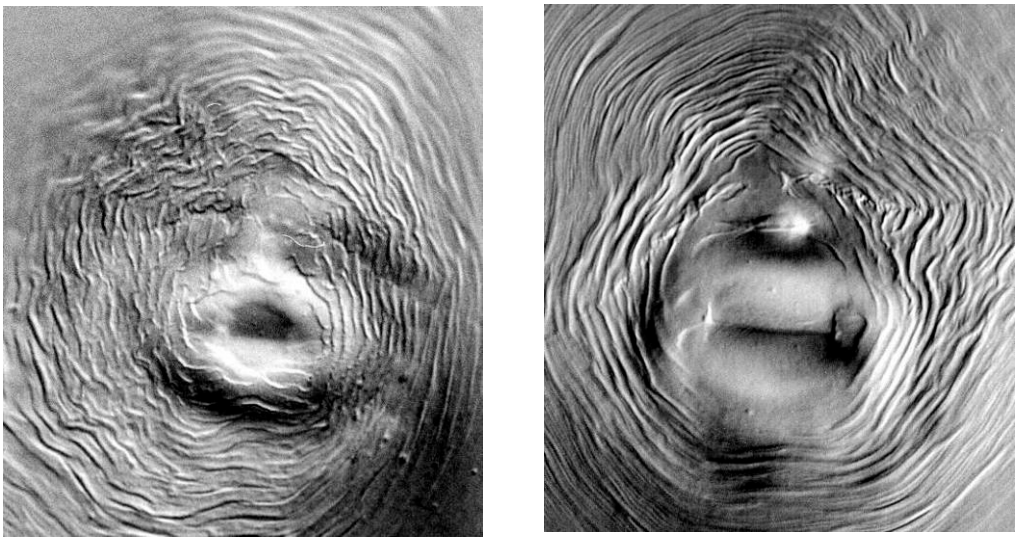
サツマイモネコブセンチュウのゴール
（線虫密度が高いとゴールが数珠状に連なる）

キタネコブセンチュウのゴール
ゴールから細根が多数伸長するのが特徴

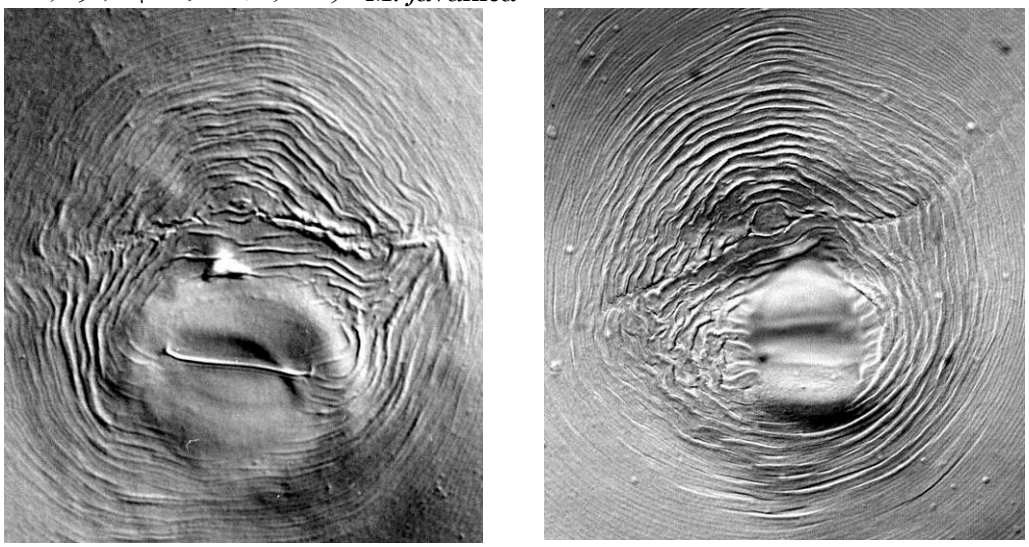
同定のポイント：雌成虫の会陰紋（Perennial pattern）の形態



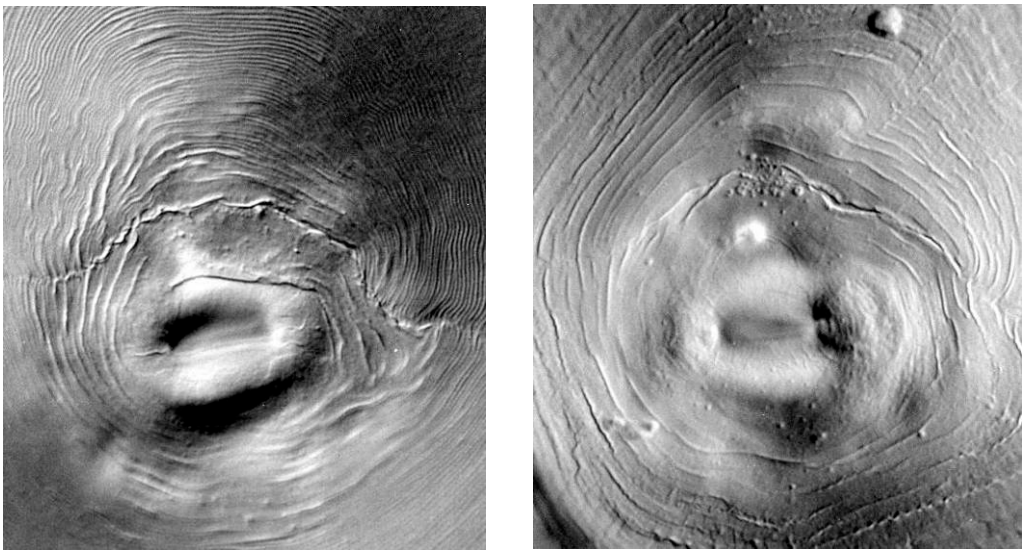
1) サツマイモネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita*



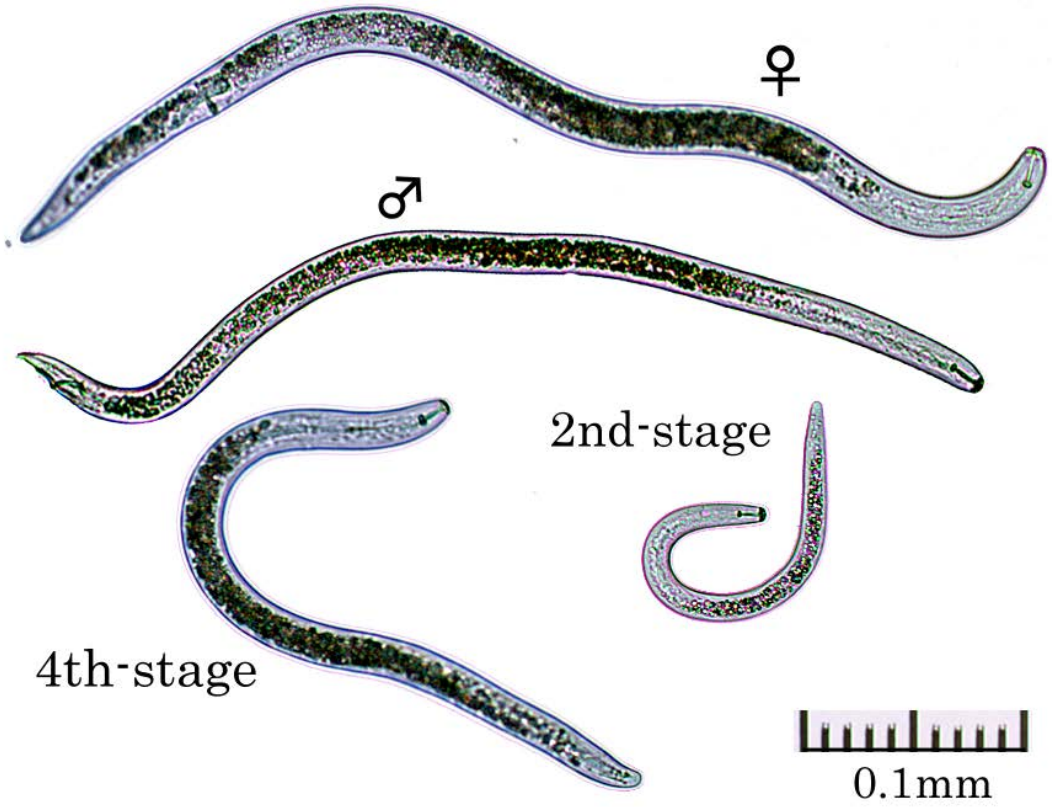
2) アレナリアネコブセンチュウ *M. javanica*



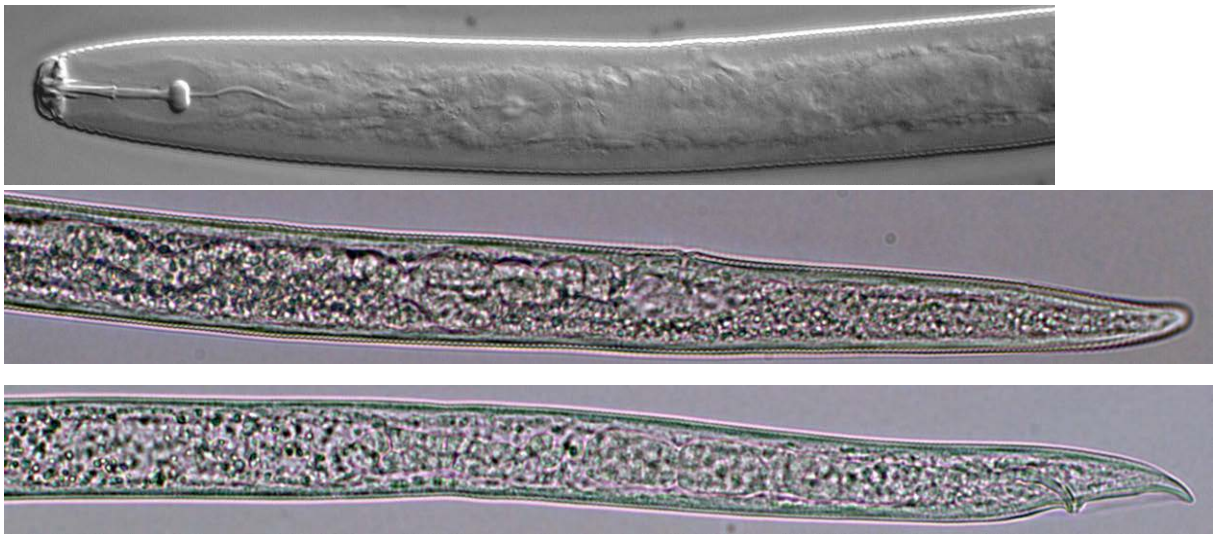
3) キタネコブセンチュウ　*M. hapla*



４．ネグサレセンチュウの特徴（参考テキスト p.17-20）



1) キタネグサレセンチュウ　*Pratylenchus penetrans*



上：雌成虫頭部、中：雌成虫尾部、下：雄成虫尾部

2) ノコギリネグサレセンチュウ　*P. crenatus*
3) ムギネグサレセンチュウ　*P. neglectus*
4) クルミネグサレセンチュウ　*P. vulunus*

５．シストセンチュウの特徴（参考テキスト p.23-28）

1）ダイズシストセンチュウ　*Heterodera glycines*

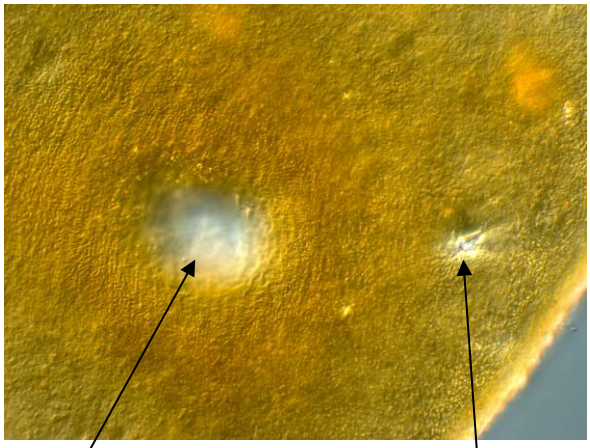
土壌から分離されたシスト（レモン形）

ダイズ根に寄生する雌成虫（白色）

2）ジャガイモシストセンチュウ　*Globodera rostochiensis*

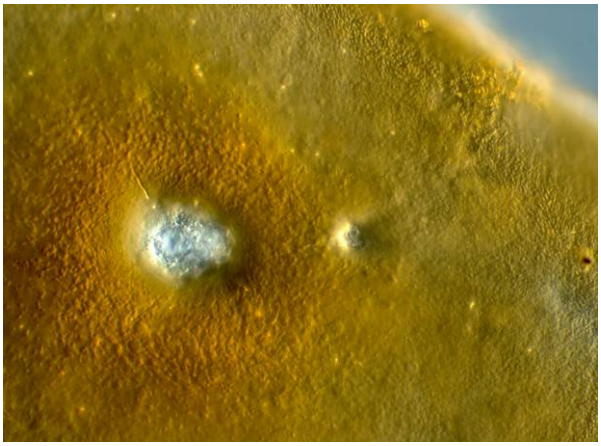
土壌から分離されたシスト（球形）

ジャガイモ根に寄生する雌成虫（黄色）



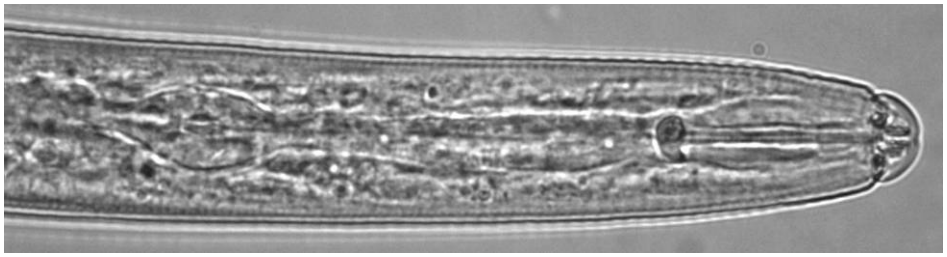
シスト尾端周辺の拡大写真

窓（中心部に陰門隙）　　肛門

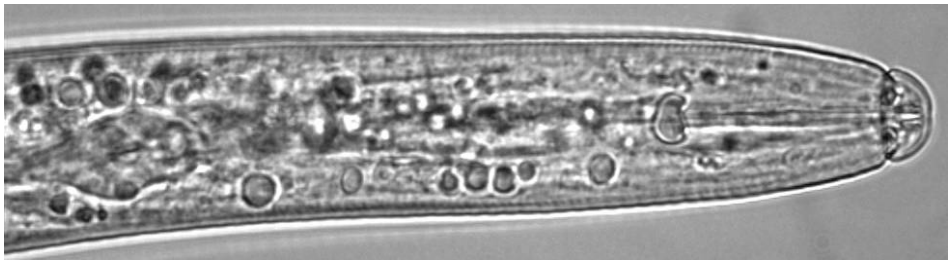


同（左とは別個体）

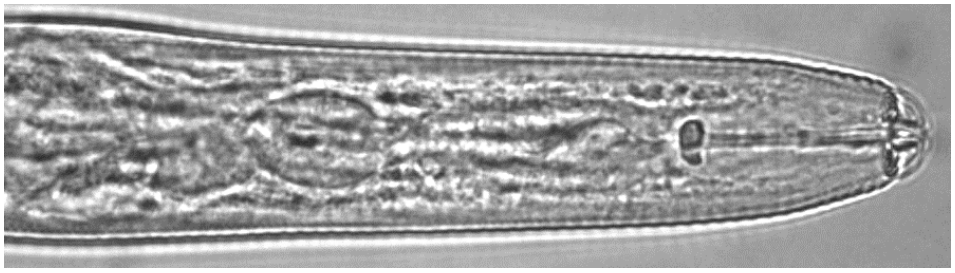
3) クローバシストセンチュウ　*Heterodera trifolii*



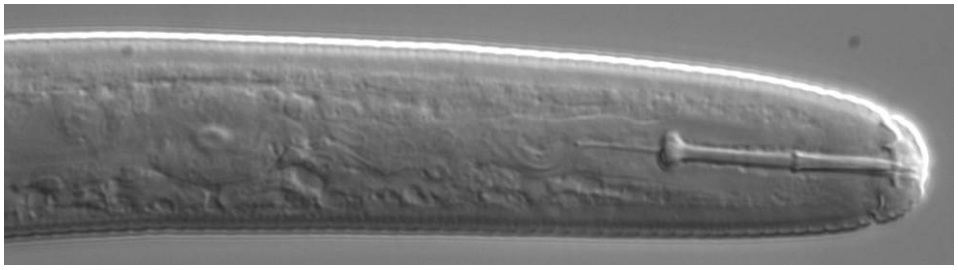
クローバシスト
２期幼虫頭部



同上



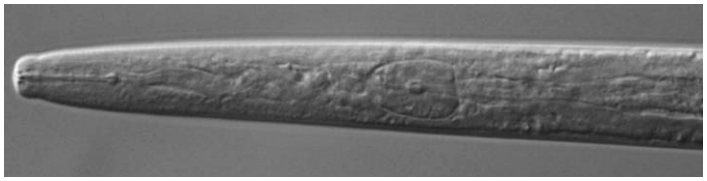
ダイズシスト
２期幼虫頭部

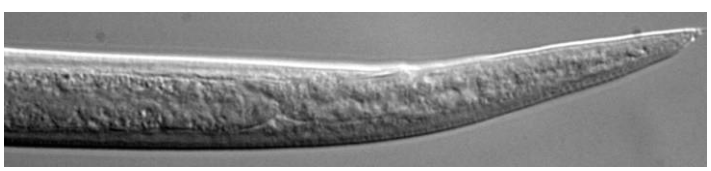


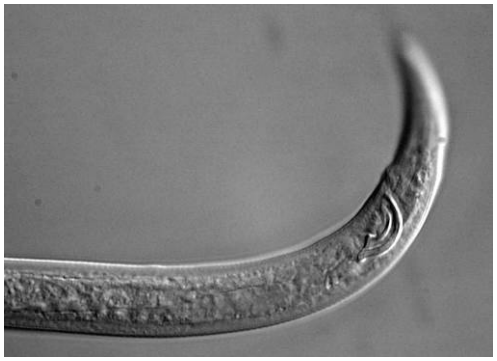
ジャガイモシスト
２期幼虫頭部

６．ハセンチュウの特徴（参考テキスト p.50-55）

イチゴセンチュウ　*Aphelenchoides fragariae*







上：雄成虫頭部、下：雌成虫尾部、右：雄成虫尾部

【研修資料：線虫種の遺伝子診断技術の実習】

平成２５年１０月３日（木）

岩堀　英晶（九州沖縄農業研究センター）
関本　茂行（中央農業総合研究センター）

《実習目的》

3 種のネグサレセンチュウ（*Pratylenchus penetrans*、*P. coffeae*、*P. vulnus*）を、PCR-RFLP 法で識別する。

PCR-RFLP:
Polymerase **C**hain Reaction-**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism
（ポリメラーゼ連鎖反応－制限断片長多型）

PCR 法により特定の遺伝領域を対象として DNA 断片を増幅し、DNA の特定の塩基配列を認識して切断する**制限酵素**を用いて PCR 産物を切断後、電気泳動により分子の大きさで DNA 断片を分離し、塩基配列の種間差により生じるサイズの差を検出することにより種を識別する手法。

本実習では、次の線虫を供試する。
・キタネグサレセンチュウ *Pratylenchus penetrans*
・ミナミネグサレセンチュウ *P. coffeae*
・クルミネグサレセンチュウ *P. vulnus*

《実習概要》

PCR 増幅の開始点となる 2 つの DNA 断片（プライマー）として TW81/AB28 のセットを用いて、核リボソーム RNA 遺伝子 ITS 領域の DNA 断片を増幅後、制限酵素 *Hinf* I 処理によって生じた断片サイズの種間差を電気泳動で検出・確認する。

《実習内容》

（１）実習項目

・線虫１頭からの DNA 抽出　　・PCR 増幅
・電気泳動用アガロースゲルの作製
・制限酵素処理（*Hinf* I 処理）　　・電気泳動

（２）実習スケジュール

１．線虫を１頭ずつ釣り上げて PCR 用チューブに入れ、**DNA 抽出**
２．全員分の DNA 抽出反応液をサーマルサイクラーにセットし、温度処理
３．温度処理の終わった抽出液に滅菌水を加えて混和
４．一班ずつ **PCR** 反応液に抽出 DNA を加えて混和
５．全員分の PCR 反応液をサーマルサイクラーにセット（昼休みまでに行う！）
６．**1.5%アガロースゲル作製**（核酸染色剤ゲルレッド入り）
７．**制限酵素** *Hin*f I 処理（1.5ml チューブ）、随時ヒートブロックへ（37℃5 分以上）
８．**電気泳動**：PCR 産物および制限処理液を**電気泳動**（100V50 分）し、泳動ゲルの撮影

《実習手順》

（１）DNA 抽出

DNA 抽出バッファー* 20 µl を 8 連 PCR チューブのキャップに分注する。キャップ（ストリップ）は穴の空いたチューブスタンドに置き、透過照明の実体顕微鏡下で線虫 1 頭を液中に釣り入れる。チューブ本体をキャップにセットし卓上遠心機でスピンダウンさせる。チューブ本体に液とともに虫体が移ったかどうかを実体顕微鏡で確認し、温度処理を行う（55℃30 分→95℃10 分→15℃）。温度処理終了後、各 80 µl の滅菌水を加えて混和し DNA 抽出液とする（5 倍希釈、全量 100 µl/頭）。

* 抽出バッファー組成（ISOHAIR（ニッポンジーン）のキット構成試薬を用いる）：0.01×Extraction Buffer 18.5 µl（SDS 含む ; TE で希釈）＋Enzyme Solution 1 µl（Proteinase K 含む）＋Lysis Solution 0.5 µl（DTT 含む）＝20 µl（線虫 1 頭あたりの液量）

（２）PCR 反応

PCR 反応液* 18 µl に、DNA 抽出液 2 µl を加えて 20 µl の反応液を調製し、サーマルサイクラーにセットして温度処理を行う。

（94℃2 分→35×[94℃30 秒→55℃30 秒→72℃1 分]→15℃：2 時間程度）

* PCR 反応液（調製済）：Quick Taq HS DyeMix（東洋紡）10 µl＋10 µM プライマー各 0.4 µl＋滅菌水 7.2 µl＝18 µl

（３）アガロースゲル作製（1.5%ゲル 50 ml の場合）

緩衝液（1.0×TAE）50 ml 中にアガロース 0.75 g を加え、軽く混和してから電子レンジに入れて加熱し、アガロースを完全に融解させる。この溶液に 10,000×ゲルレッドを 5 µl 加えて混和させる。ゲル板とコームをセットしたゲルメーカーにこのアガロース溶液を熱いうちに注ぎ、気泡を取り除いてから室温静置する（30～60 分程度）。完全に凝固したゲルからコームを静かに抜き、ゲル板ごと電気泳動装置に移す。

（４）制限酵素処理（FastDigest *Hinf* I：フェルメンタス／コスモ・バイオ）

取扱説明書に従い、以下の通り順番に加える：①滅菌水 17 µl＋②10×Green Buffer 2 µl＋③PCR 産物 10 µl＋④FastDigest *Hinf* I 1 µl

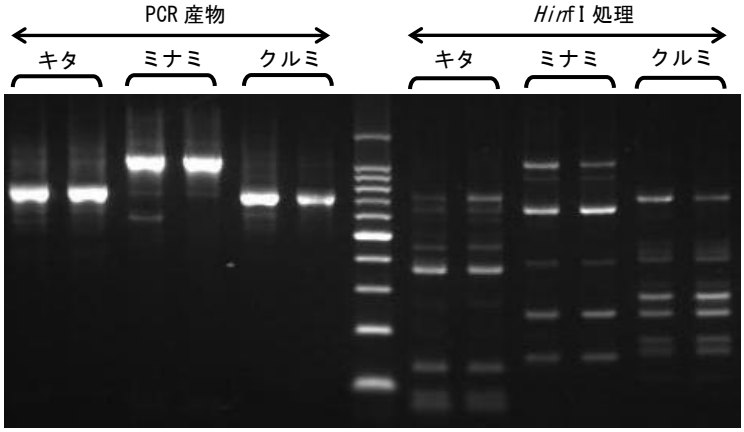
→温度処理 37℃5 分（必要であればその後 60℃20 分の熱変性）

→そのままゲルにアプライして電気泳動

（５）電気泳動

1.0×TAE を入れた泳動槽に、作製済みの 1.5%アガロースゲルをセットする。PCR 産物または制限酵素処理済 PCR 産物を 5 µl をマイクロピペットでとり、ゲルの穴（ウェル）に注入（アプライ）する。必要に応じてサイズマーカーもアプライする。泳動するすべてのサンプルをアプライした後、フタをして 100V・50 分通電する。泳動終了後、ゲルを取り出して UV イルミネーター上で泳動像を確認・撮影する。（※核酸染色剤ゲルレッドは毒性が極めて低い物質であるが、取り扱いに注意）

＜泳動結果の例＞



《参考：プライマー配列》・

TW81：5’-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3′

AB28：5’-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3′

（出典：Joyce et al. (1994) Cost 812 pp. 178-187; Zheng et al. (2000) Russ. J. Nematol. 8, 109-113）

《参考文献：国内産ネグサレセンチュウの PCR-RFLP》

Orui, Y. (1996) Appl. Entomol. Zool. 31(4), 505-514.

Orui, Y. and Mizukubo, T. (1999) Appl. Entomol. Zool. 34(2), 205-211.